

09/529397

PCT/JP99/04399

13.08.99

日本国特許庁

JP 99/4399 PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EJU

REC'D 01 OCT 1999
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年11月24日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第333284号

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT

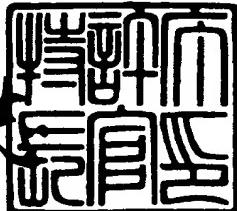
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月 2日



特許長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平11-3061800

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PA907855
 【提出日】 平成10年11月24日
 【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
 【国際特許分類】 C12N
 【発明の名称】 R a f - 1 に特異的に結合し得る核酸
 【請求項の数】 10
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都文京区向丘1-20-6-607
 【氏名】 横山 茂之
 【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県朝霞市北原2-7-9-403
 【氏名】 平尾 一郎
 【特許出願人】
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
 【代表者】 理事長 中村 守孝
 【代理人】
 【識別番号】 100102668
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 佐伯 憲生
 【電話番号】 03-5205-2521
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 039251
 【納付金額】 21,000円
 【提出物件の目録】
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 R a f - 1 に特異的に結合し得る核酸

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛋白質 R a f - 1 に特異的に結合し得る核酸であって、配列表の配列番号 1 ~ 4 のいずれかひとつまたはそのうちの 1 個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは 1 個以上の塩基が付加されてなる塩基配列又はその相補鎖からなる塩基配列を有する核酸。

【請求項 2】 核酸が R N A である請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の核酸からなる細胞のシグナル伝達の制御剤。

【請求項 4】 核酸が R N A である請求項 3 に記載の制御剤。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 に記載の核酸を使用する細胞のシグナル伝達を制御する方法。

【請求項 6】 核酸が R N A である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 請求項 1 又は 2 に記載の核酸を含有してなる医薬組成物。

【請求項 8】 癌又は炎症の治療のための請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】 ランダムな塩基配列を有する R N A のプールから、 R a f - 1 への結合能を有する R N A をセレクションすることからなる、 R a f - 1 への特異的な結合能を有する R N A を選別する方法。

【請求項 10】 ランダムな塩基配列を有する R N A のプールの R N A が、 20 ~ 300 の塩基からなる R N A である請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、 R a s の標的蛋白質に特異的に結合する新規な核酸（アプタマー）に関する。より好ましくは、本発明は、 R a f - 1 に特異的に結合する新規な R N A アプタマーに関する。また、本発明は、本発明の核酸を使用する細胞の増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御、及び、これを用いた医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

Rasはグアニンヌクレオチド結合タンパクであり、細胞のシグナル伝達に関与している蛋白質である。細胞のレセプターが活性化されると、細胞内のRas蛋白質にGDPが結合して、「GDP結合型Ras」となる。形成された「GDP結合型Ras」はさらにリン酸化されて、「GTP結合型Ras」になる。

この「GTP結合型Ras」は、Raf-1、B-Raf、RGL、Ral GDS、MEKK、P13KなどのRasの標的蛋白質に結合して、必要なシグナルを細胞内に伝達してゆく。

【0003】

これらのRasの標的蛋白質には、GTP結合型Rasが結合し得るRas結合ドメインがあり、GTP結合型Rasはこのドメインに結合することにより細胞内にシグナルを伝達してゆく。

このようにRasは、細胞内のシグナル伝達のキーとなる蛋白質であり、Raf-1などの「Rasの標的蛋白質」は、Rasからのシグナルをその種類に応じて伝達してゆく細胞内シグナル伝達系の中核となるものである。

【0004】

したがって、「Rasの標的蛋白質」におけるGTP結合型Rasとの結合ドメインを特異的にブロックし得る物質があれば、細胞内のRasによるシグナル伝達系を特異的に阻害することが可能となり、当該シグナル伝達に起因する各種疾患の治療や予防に有用になる。例えば、がん細胞においては、「Rasの標的蛋白質」による増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御を特異的に阻害することにより、がん細胞の増殖や分化を停止させて、がんの治療や転移を防止することができるようになる。

【0005】

ところで、「Rasの標的蛋白質」のひとつであるRaf-1は、細胞質に存在するセリン／スレオニンプロテインキナーゼであり、GTP結合型Rasと結合することにより活性が誘導される。活性化されたRaf-1は、マイトージェン活性化蛋白キナーゼ (mitogen-activated protein kinases) のファミリーの

ひとつであるMARK/ERKキナーゼ(MEKs)を活性化し、これをホスホリレート エクストラセルラー シグナル-レギュレーテッド キナーゼ(phosphorylates extracellular signal-regulated kinases)に転換し、細胞内のシグナル伝達系に関与している(Daum, G., et al., (1994) Trends Biochem. Sci. 19, 474-480.; Avruch, J., et al., (1994) Trends Biochem. Sci. 19, 279-283.)。

【0006】

このようなRaf-1の細胞内のシグナル伝達系を解明するために、Ras又はRaf-1の機能を選択的に阻害する方法が利用されてきた(deVries-Smits, A.M., et al., (1992) Nature 357, 602-604.)。これらの研究には、キナーゼ活性を有しないRaf-1変異体によるRas機能の阻害や(Kolch, W., et al., (1991) Nature 349, 426-428.)、Raf-1のキナーゼドメインに結合する抗体によるRaf-1キナーゼの阻害(Kolch, W., et al., (1996) Oncogene 13, 1305-1314.)などが含まれている。

【0007】

しかしながら、これらの阻害作用は、RasやRaf-1によるシグナル伝達系の特定の一部を特異的に阻害するものではなく、Rasとの結合機能やキナーゼ機能などの多数の機能を同時に多面的に阻害することから、阻害されるシグナル伝達系を特定することはできず、シグナル伝達系の個々の特定のメカニズムを充分に解明することはできなかった。

したがって、Raf-1へのRasの結合を特異的に阻害し得る分子種の開発が、シグナル伝達系の役割を解明してゆくために重要となってきている。

【0008】

現在のところ、Rasの下流のシグナル伝達経路は完全には解明されてはいないが、このような分子種が開発されれば、特定の一部の経路を特異的に阻害することができる分子種を用いることによって、Rasが関わるシグナル伝達の経路を解明し、Rasの標的蛋白質によるシグナル伝達経路を詳細に解明することができるばかりでなく、細胞内でのシグナルの伝達を制御することができることになり、腫瘍などの細胞内のシグナル伝達に関与している各種疾患の治療、予防が

可能となる。

【0009】

一方、このようなRasが関わる細胞内のシグナル伝達の経路の中の「Rasの標的蛋白質」の構造解析も行われてきており、そのひとつであるRaf-1のRas結合ドメイン(RBD)は、Raf-1のN末端からの51-131位であることが知られてきている(Vojtek, A.B., et al., (1993) Cell 74, 205-214.; Chuang, E., et al., (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 5318-5325.)。

【0010】

また、非核酸分子種に結合する蛋白質などのある種のターゲットに対して、高親和性を有するRNA又はDNAなどの核酸分子種(アプタマー類)が、「インビトロセレクション」(in vitro selection)法(Ellington, A.D. et al., (1990) Nature 346, 818-822.; Tuerk, C. et al., (1990) Science 249, 505-510.)により単離されてきている(Bock, L.C., et al., (1992) Nature 355, 564-566.; Qiu Qiu, Y.L., et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22, 5229-5234.; Gal, S.W., et al., (1998) Eur. J. Biochem. 252, 553-562.; Bell, S.D., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 14309-14314.)。

さらに、本発明者らは、Rasの標的蛋白質類に特異的に結合し得る核酸類、特にRNAアブタマー類についての特許出願をしてきた(特願平10-242596合)。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、Raf-1、B-Raf、RGL、Ral GDS、MEKK、P13Kなどの「Rasの標的蛋白質」のRas結合ドメイン(RBD)に特異的に結合して、「GTP結合型Ras」との結合を特異的に阻害することができる核酸分子種を提供するものである。

【0012】

本発明者らは、インビトロセレクション(In vitro selection)法を用いることにより、「Rasの標的蛋白質」のRas結合ドメインに特異的に結合する核酸分子種を得ることができることを見出した。例えば、この手法により「Ras

の標的蛋白質」のひとつであるRaf-1のRas結合ドメイン（RBD）をターゲットとした新規なRNAアプタマーを得、そのRNA配列を決定することができた。このRNAアプタマーは、RasとRaf-1の結合を特異的に阻害することができる。

【0013】

Rasの標的蛋白質が関与するシグナル伝達の経路の解明およびシグナル伝達の阻害がもたらす生理作用を解明するためには、Rasの標的蛋白質、より詳細にはRaf-1に特異的に結合することにより、Raf-1と特に細胞内で重要な役割をになうRasとの結合を特異的に阻害し、かつ強力な作用を有する物質の開発が求められている。したがって、本発明は、Rasの標的蛋白質、より詳細にはRaf-1、特にそのRBDに特異的に結合する新規なRNAアプタマー、当該RNAアプタマーを用いたシグナル伝達系の制御剤、その制御方法、及び、それを含有してなる医薬組成物を提供するものである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は、Ras蛋白質とRasの標的蛋白質が関与する細胞のシグナル伝達系を特異的に制御するための新規な核酸を提供するものである。

本発明は、Rasの標的蛋白質に結合し得る新規な核酸、好ましくはRNAに関する。より詳細には、本発明は、Raf-1に特異的に結合し得る核酸、好ましくはRNAに関する。

【0015】

より具体的には、本発明は、Raf-1に特異的に結合し得る核酸であって、配列表の配列番号1～4のいずれかひとつの塩基配列若しくはその1個以上の塩基が欠失、付加、置換されていてもよい塩基配列、又は、それに対応した塩基配列を有する核酸、好ましくはRNAに関する。

本発明の前記配列番号で示されるRNAは、Raf-1への結合能を有するものであり、より詳細にはRaf-1のRas結合ドメイン（RBD）に特異的に結合することを特徴とするものである。

【0016】

本発明のRNAは、必要により逆転写して、前記したRNAと相補的な塩基配列を有する1本鎖又は2本鎖のDNAとすることもできる。したがって、本発明は、配列表の配列番号1～4のいずれかひとつの塩基配列、又は、そのうちの1個以上の塩基が欠失し、他の塩基で置換され、及び／若しくは1個以上の塩基が付加されてなる塩基配列を有するRNA又はDNAなどの核酸類に関する。

【0017】

さらに、本発明は、前記したRNAからなる細胞のシグナル伝達の制御剤、又は、これらのRNAを用いた細胞のシグナル伝達を制御する方法に関する。

また、本発明は、前記したRNAを含有してなる医薬組成物、より詳細には細胞のシグナル伝達系が関与する疾患、例えば、癌又は炎症の治療、予防のための医薬組成物に関する。

【0018】

本発明の「Rasの標的蛋白質」とは、細胞のシグナル伝達に関与しているRas蛋白質、好ましくはGTP結合型Ras蛋白質と結合して細胞内のシグナル伝達系を形成する一群の蛋白質をいう。本発明の「Rasの標的蛋白質」としては、例えば、Raf-1、B-Raf、RGL、Raf1 GDS、MEKK、P13Kなどが挙げられるがこれに限定されるものではない。本発明の好ましい「Rasの標的蛋白質」としてはRaf-1などが挙げられる。

【0019】

本発明は、前記した「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合し得る核酸分子種が存在することを明らかにしたものであり、したがって、本発明の「Rasの標的蛋白質」と特異的に結合する核酸としては、RNAであってもDNAであってもよく、これらのRNA又はDNAが「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合するものであれば特に制限はない。また、本発明の核酸は、ひとつの「Rasの標的蛋白質」にのみ特異的に結合するものであってもよいが、2種以上の「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合するものであってもよい。

【0020】

本発明の核酸の長さは、「Rasの標的蛋白質」に特異的に結合できるに充分な長さを有するものであれば特に制限はないが、20～300塩基、好ましくは

20~150塩基、より好ましくは30~150塩基、さらに好ましくは30~120塩基のものがよい。結合の特異性を強調する場合には、長いものが好ましいが、合成方法などの入手手段の簡便性からは短いものが好ましい。

【0021】

本発明における「アプタマー」とは、蛋白質の特定のドメインに結合し得る核酸分子種のことをいい、当該核酸としてはRNAでもDNAでもよい。RNAからなるアプタマーを「RNAアプタマー」という。

【0022】

本発明の核酸（アプタマー）は、種々の方法で製造することができる。アプタマーの塩基配列がわかっている場合には、これを合成することもできる。

【0023】

本発明のアプタマーの配列がわからない場合には、公知の「インビトロセレクション」(in vitro selection)法(Ellington, A.D. et al., (1990) Nature 346, 818-822.; Tuerk, C. et al., (1990) Science 249, 505-510.)によりアプタマーを選別してくることができる。

次に、本発明における「インビトロセレクション」法を説明する。

【0024】

まず、20~300塩基、好ましくは30~100塩基、より好ましくは30~70塩基のランダムな塩基配列のRNA類を調製する。これらのRNAはランダムな配列を含む合成DNAから転写反応によって調製される。

このランダムな配列を有するDNA類の5'端及び3'端に、PCR法におけるプライマーとなるべき塩基配列をつける。この場合のプライマーとしては、特に制限はないが、後にこのプライマー部分を切断できるように制限酵素による切断配列を有するものが好ましい。プライマーとなる部分の長さにも特に制限はないが、約20~50塩基、好ましくは20~30塩基程度である。

また、5'端のプライマーには、T7RNAポリメラーゼのプロモーター配列を加えて、DNAからRNAへの転写反応を可能にする。

【0025】

このようにして両端にプライマーとしての塩基配列を有し、中央部にランダム

な塩基配列を有するRNA群（RNAプール）をDNAから転写反応によって調製する。

次いで、このRNAプール中のRNAと、「Rasの標的蛋白質」、例えば、Raf-1、又は、その結合ドメインからなるペプチドを接触させて、「Rasの標的蛋白質」に結合するRNAを分離する。得られたRNAを逆転写してcDNAとし、前記のプライマーを用いてPCR法により増幅する。増幅されたDNAを転写してRNAとし、これを前記したRNAプールへ戻す。

【0026】

以上の、RNAプール中での「Rasの標的蛋白質」との接触、結合したRNAの分離、逆転写、PCR法による増幅、及び、増幅されたRNAの元のRNAプールへの注入からなるサイクルを「ラウンド」と称する。即ち、1ラウンドとは前記のラウンドを1回行うことをいう。

【0027】

RNAプールを用いた前記したラウンドを行うと、RNAプール中の「Rasの標的蛋白質」に結合するRNAの量が増加し、しかも特異的に結合する塩基配列を有するRNAの量が増加してくるので、ラウンド繰り返し行うことによりより特異的に結合するRNAを選別することができるようになる。このようなラウンドは、5～50ラウンド、好ましくは5～30ラウンド行われる。

【0028】

前記した「インビトロセレクション」法により選別されてきたRNAは、常法によりその塩基配列を決定し、常法により逆転写してcDNAとすることもできる。また、必要により前記したプライマーとして使用された部分を切断することもできる。

このようにして、本発明のアプタマーを得ることもできる。

【0029】

本発明の「インビトロセレクション」法を、より具体的に説明する。

【0030】

(1) DNAプールの調製：5'-ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcga ggcatt -3'、3'末端に5'-catat gcctt agcga cagca agctt ctgc

-3'の配列を有するランダムな45塩基を含む一本鎖DNAプール(200pmol、 1.2×10^{14} 分子)を合成により得る。この一本鎖DNAのプールを、PCRで二本鎖のDNAのプールとする。

(2) DNAよりRNAへの転写によるRNAプールの調製：(1)で得られたDNAプールをin vitro転写でランダムな配列を含むRNAのプールとする。

(3) Raf-1 RBDに結合するRNAの選別：(2)あるいは(5)で得られたRNAプール中に存在するRaf-1 RBDへの結合能を有するRNAを選別する。

【0031】

(4) 選別されたRNAよりDNAへの逆転写：(3)で選別されたRNAを逆転写し、得られたDNAをPCRに付し増幅しDNAのプールとする。

(5) RNAプールの調製：(4)で得られた増幅されたDNAプールをin vitroで転写し、Raf-1 RBDに結合するRNAの存在比が増加したRNAのプールとする。

(6) Raf-1 BBDに結合するRNAの選別、RNAよりDNAへの逆転写、増幅、DNAよりRNAへの転写の繰り返し：(3)から(5)の行程を繰り返す(ラウンド)ことにより、RNAプール中のRaf-1 RBDに結合するRNAの存在比は上昇する。

(7) Raf-1 RBDに結合するRNA配列の決定：繰り返し後の(6)で得られたRaf-1 RBDに結合するRNAを逆転写しDNAを得、大腸菌プラスミドへ組み込み、クローニングを経てDNA配列を決定する。これにより(6)で得られたRaf-1 RBDに結合するRNAの配列が決定出来る。

さらにRaf-1 RBDに結合するRNAを逆転写しDNAを得、PCRにより3'側を短縮したDNAを得、これを転写して3'側を短縮したRNAを得ることが出来る。

【0032】

このようにして得られたRaf-1 RBDに結合する新規なRNAの配列は以下の通りであり、配列表の配列番号1～4に示す。

【0033】

配列1

gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuaaua 60
 auugguuuuua gcauaugccu uagcgacagc aagcuucugc 100

【0034】

配列2

gggaguggag gaauucaucg aggcaugacc ucccguggca guagggguaa aaauuaucuu 60
 ccuacacuuuc ucaugccuuua gcgcacagcaa gcuucugc 98

【0035】

配列3

gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuaaua 60
 auugguuuuua gcauaugccu uagcgacagc 90

【0036】

配列4

gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuaaua 60
 auugguuuuua gcauaugccu 80

【0037】

配列番号1、2、4に示すRNAのGST-RBDとのKd値はそれぞれ次のとおりであった。

配列1のRNA : 124 nM

配列2のRNA : 295 nM

配列4のRNA : 176 nM

そして、配列1～4のRNAは全て用量依存的にRasとRaf-1 RBDとの結合を阻害した。

【0038】

これらの結果から配列1の3'側より1塩基づつ減少し配列4に至るまでの99～81塩基のRNA(90塩基が配列3に相当する)も活性を有することが推測される。

【0039】

ここに得られた配列1～4のRNAアブタマーは、合成DNAより転写により得ることが可能でありまた合成して得ることも可能である。

既に特許出願した（特願10-242596号）RNAと比較し本発明のRNAアブタマーの結合活性は強く、RNAの塩基数はより少なく、有用性が増している。

これらはRasやRaf-1のキナーゼ活性に影響せずRasとRaf-1との結合を特異的に阻害出来る。がん細胞においては、増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御が働くなくなるので、このシグナル伝達を制御することは杭がん作用に繋がる可能性がある。したがってこのRNAアブタマーは新規な抗がん剤としての可能性を有している。またシグナル伝達系が関与する各種の疾患の治療、予防または診断にも適用可能である。

Rasの下流のシグナル伝達経路は完全には解明されてはいないが、一部の経路を特異的に阻害することができるRNAアブタマーを用いることによって、Rasが関わるシグナル伝達の経路を詳細に調べることができる。

【0040】

一方、キナーゼ活性を有しないRaf-1変異体やRaf-1のキナーゼドメインに結合する抗体が、細胞のシグナル伝達系におけるRasやRaf-1の役割を研究するために使用してきた（Kolch, W., et al., (1991) Nature 349, 426-428. ; Kolch, W., et al., (1996) Oncogene 13, 1305-1314.）。

キナーゼ活性を有さずにRasに結合し得るRaf-1変異体は、Ras依存のRaf-1活性を阻害するのみならず、Rasを含む広範囲なシグナル伝達系をブロックする。これは、この変異体がRaf-1の結合を阻害するのと同様に、GTP結合型Rasの種々の下流のエフェクターへも影響を与えるからである。

【0041】

同様に、Raf-1のキナーゼドメインのエピトープに結合するモノクローナル抗体は、Raf-1含む全てのシグナル伝達系を阻害する。これは、Raf-1は、GTP結合型のRasによって活性化されるのみならず、Rasとは無関係な経路によって活性化されるからである（Kolch, W., et al., (1996) Oncoge

ne 13, 1305-1314.)。

【0042】

このような観点からみても、本発明のRBDに対するRNAアプタマーは、RasやRaf-1のキナーゼ活性に何等の影響を与えることなく、RasとRaf-1との結合を特異的に阻害できるものであるといえる。

さらに、本発明のRNAアプタマーは細胞内において発現させることが可能であり (Good, P.D., et al., (1997) Gene Ther. 4, 45-54.)、広範囲な分野に適用可能なものである。例えば、ヒトの病気の治療の場合には、炎症の治療 (Charlton, J., et al., (1997) Chem. Biol. 4, 809-816.) や、肺炎のRNA治療 (Bless, N.M., et al., (1997) Curr. Biol. 7, 877-880.) などに適用できる。

【0043】

このように、本発明のRNAアプタマーは、「Rasの標的蛋白質」、より好ましくはRaf-1のRBDを特異的にブロックするものであり、細胞内のシグナル伝達を制御剤として使用できるのみならず、シグナル伝達系が関与する各種の疾患の治療、予防又は診断の分野への適用に特に適しているものである。

【0044】

本発明の核酸類を細胞のシグナル伝達系の制御に使用する場合には、本発明の核酸と直接目的とする細胞へ導入してもよいが、これをウイルスなどに組み込んで細胞に導入することもできる。

また、RNAを直接導入するのではなく、DNAの形で導入することもできる

。

【0045】

本発明の核酸を医薬組成物として使用する場合には、これをそのまま非経口投与することもできるが、ウイルスやDNAの形で各種ベクターに組み込んで投与することもできる。これらの投与形態においては、製薬上許容される担体を用いて医薬組成物とすることもできる。

本発明の医薬組成物は、細胞のシグナル伝達系に関与する各種疾患、特に悪性腫瘍や炎症の治療、予防又は診断に有用である。

【0046】

【実施例】

以下に実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0047】

実施例1（最初のRNAプールの作成）

5'末端に5'-ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcga ggcatt-3'、3'末端に5'-catat gcctt agcga cagca agctt ctgc-3'の配列を有するランダムな45塩基を含む一本鎖DNA（200pmol、1.2×10¹⁴分子）を5'-ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcg-3'および5'-gcaga agc tt gctgt cgcta aggc-3'の2つのプライマーを用いてPCRを行い、次いでT7 RNAポリメラーゼで転写し最初のRNAプールとした。

【0048】

実施例2（Raf-1 RBDに結合するRNAの選別）

75°Cで3分間加温後冰冷したRNAプール3μM（1800pmol）およびGST-RBD 1 μM（600pmol）を結合バッファー-600μl中37°Cで1時間インキュベートした。ニトロセルロースフィルターでろ過し、フィルターを洗净バッファー-300μlで3回洗净後フィルター上のRNAを7M尿素を含むバッファーで溶出した。逆転写後PCRを12サイクル行った。

ここで用いた試薬類は次のとおりである。

GST-RBD：RBD（Raf-1の51～131アミノ酸部分）とグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質は文献（Shirouzu, M., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 7737-7742.）に記載されている。

結合バッファー：5mM MgCl₂含有リン酸緩衝生理食塩水。

洗净バッファー：20mM Tris-HCl pH7.5、5mM MgCl₂および150mM NaCl。

【0049】

実施例3（配列番号1および2のRNA）

実施例2の最初のRNAプールよりRaf-1 RBDに結合するRNAの選別、RNAよりDNAへの逆転写、増幅、DNAよりRNAへの転写を10回繰り

返し配列表の配列番号1および2のRNAを得た。

【0050】

実施例4（配列番号3および4のRNA）

配列1のRNAの相補的な配列を有するDNAをプライマー-5'-ggtaa tacga ctcac tatag ggagt ggagg aattc atcg -3' とプライマー-5'-gctgt cgcta aggca tatgc taaaa c -3'あるいは5'-aggca tatgc taaaa ccaat ttata ac-3'を用いてPCRにより3'末端側を短くしたDNAを得、これより配列表の配列番号3および4のDNAを得た。

【0051】

実施例5（クローニングと配列の決定）

DNAはTOPOT Aクローニングキットを用いてクローニングし、自動DNAシーケンサーで配列を決定した。

【0052】

実施例6（Kd値の測定）

4nMの5'末端をラベルしたRNAと50~1, 250nMのGST-RBDを結合バッファー-600μl中37℃で30分間インキュベートした。ニトロセルロースフィルターでろ過し、フィルター上の放射活性を測定した。Kd値はソフトウェア：カレイダーグラフを用いて計算した (Bell, S.D., et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 14309-14314.)。

【0053】

実施例7（結合阻害実験）

0.05%トリトン(Triton)X-100を含有する結合バッファー-160μl中のGST-RBD20pmolと10μlのグルタチオンセファローズ4Bビーズを含むリン酸バッファー(生理食塩水)とを混合し4℃で30分間インキュベートした。ビーズを分離し20pmolのRasおよびRNA(0, 20, 100, 200pmol)と結合バッファー(5mM, MgCl₂含有リン酸緩衝生理食塩水)160μl中で4℃で30分間インキュベートした。ビーズを洗浄後結合している蛋白質をラエムリのバッファーで溶出させ、SDS-PAGE後、抗Ras抗体RAS004 (Kanai, T., et al., (1987) Jpn. J. Ca

ncer Res. 78, 1314-1318.) を用いてイミュノプロットし ECL 免疫検出装置で視覚化した。

配列番号 1 ~ 4 の RNA は RNA 量に応じ Ras の量の低下が認められた。

【0054】

【発明の効果】

本発明は、 Raf-1 などの Ras の標的蛋白質に特異的に結合し、さらには Ras との結合を阻害する RNA が得られたことであり、これらの RNA を用いた細胞内のシグナル伝達経路の特異的阻害方法を提供するものである。本発明により、細胞の特定の経路によりシグナル伝達経路を解明することが出来るのみならず、副作用の少ない医薬組成物を提供することが出来る。

ここに得られた配列 1 ~ 4 の RNA アブタマーは、合成 DNA より転写により得ることが可能でありまた合成して得ることも可能である。

既に特許出願した RNA と比較し結合活性が強く、 RNA の塩基数は少なく、有用性が増している。

これらは Ras や Raf-1 のキナーゼ活性に影響せず Ras と Raf-1 との結合を特異的に阻害出来る。がん細胞においては、増殖や分化をひきおこすシグナル伝達の制御が働くなくなるので、このシグナル伝達を制御することは抗がん作用に繋がる可能性がある。したがってこの RNA アブタマーは新規な抗がん剤としての可能性を有している。またシグナル伝達系が関与する各種の疾患の治療、予防または診断にも適用可能である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Nucleic acid which may bind specifically to proteins Raf-1

<130> PA907855

<160> 4

<210> 1

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 1

gggaguggag gaauucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa 60
 auugguuuuua gcauaugccu uagcgacagc aagcuucugc 100

<210> 2

<211> 98

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 2

gggaguggag gaauucaucg aggcaugacc ucccguggca guagggguaa aaauuaucuu 60
 ccuacacuuc ucaugccuua gcgacagcaa gcuucugc 98

<210> 3

<211> 90

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 3

gggaguggag gaaaucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa 60

auugguuuuua gcauaugccu uagcgacagc 90

<210> 4

<211> 80

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> protein bind

<223> RNA aptamer

<400> 4

gggaguggag gaaaucaucg aggcauaugu cgacuccguc uuccuucaaa ccaguuauaa 60

auugguuuuua gcauaugccu 80

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、Rasの標的蛋白質が関与するシグナル伝達の経路の解明およびシグナル伝達の阻害がもたらす生理作用を解明するためには、Rasの標的蛋白質、より詳細にはRaf-1に特異的に結合することにより、Raf-1と特に細胞内で重要な役割をなうRasとの結合を特異的に阻害し、かつ強力な作用を有する新規な核酸を提供する。

【解決手段】 本発明は、Rasの標的蛋白質、より詳細にはRaf-1、特にそのRBDに特異的に結合する新規なRNAアプタマー、当該RNAアプタマーを用いたシグナル伝達系の制御剤、その制御方法、及び、それを含有してなる医薬組成物に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100102668

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9

階 たくみ特許事務所

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団